

**NEW PHARMACOLOGICAL ACTION OF POLYSULFATED  
MUCOPOLYSACCHARIDES**

**Patent number:** JP2001335490  
**Publication date:** 2001-12-04  
**Inventor:** AKATSUKA MASAHIRO; IWASAKI KATSUhide;  
TOUBETSUTO KENJI  
**Applicant:** MARUHO KK  
**Classification:**  
**- international:** A61K31/726; A61K31/727; A61K31/728; A61P9/10;  
A61P17/00; A61P17/04; A61P17/06; C08B37/08;  
C08B37/10  
**- european:**  
**Application number:** JP20000154691 20000525  
**Priority number(s):** JP20000154691 20000525

**Report a data error here**

**Abstract of JP2001335490**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To inhibit hyperplasia of endangium, inflammatory responses and inflamamtory diseases. **SOLUTION:** This selectin-dependent cell adhesion inhibitor, an adhesion molecule expression inhibitor of skin keratinized cells, an inhibitor of endangium hyperplasia and angiostenosis or a prophylactic or a therapeutic agent for skin microbisms or the like comprises polysulfated mucopolysaccharides as an active ingredient.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-335490

(P2001-335490A)

(43) 公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 31/726		A 6 1 K 31/726	4 C 0 8 6
31/727		31/727	4 C 0 9 0
31/728		31/728	
A 6 1 P 9/10	1 0 1	A 6 1 P 9/10	1 0 1
17/00	1 0 1	17/00	1 0 1
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-154691(P2000-154691)

(22) 出願日 平成12年5月25日 (2000.5.25)

(71) 出願人 000113908

マルホ株式会社

大阪府大阪市北区中津一丁目5番22号

(72) 発明者 赤塚 正裕

兵庫県加古郡播磨町野添1211-1-708

(72) 発明者 岩崎 勝秀

兵庫県川西市久代6-2-3-207

(72) 発明者 当別当 健司

兵庫県三田市すずかけ台2-26-1

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多硫酸化ムコ多糖類の新規薬理作用

(57) 【要約】

【課題】 血管内膜の肥厚や炎症反応の抑制並びに炎症性疾患の抑制。

【解決手段】 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする、セレクチン依存性細胞接着阻害剤、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害剤、血管内膜肥厚及び血管狭窄阻害剤、又は皮膚細菌感染症等の予防又は治療薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とするセレクチン依存性細胞接着阻害剤。

【請求項2】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする血管内膜肥厚及び血管狭窄阻害剤。

【請求項3】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする動脈硬化の予防又は治療薬。

【請求項4】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする皮膚角化細胞の接着分子発現阻害剤。

【請求項5】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする皮膚細菌感染症の予防又は治療薬。

【請求項6】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする移植片対宿主病の予防又は治療薬。

【請求項7】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする扁平苔癬症の予防又は治療薬。

【請求項8】多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用に基づく乾癬の予防又は治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とするセレクチン依存性細胞接着阻害剤、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】サルに高コレステロール食を負荷すると、その大動脈血管内皮に白血球が接着し、浸潤している像が認められる。また、若年者の部検例においても同様の像が観察されることから、この白血球の血管内皮への接着、浸潤が動脈硬化形成の初期病変として重要であると考えられている。

【0003】血液中に循環する白血球は、炎症が惹起されるとサイトカイン等で活性化された血管内皮細胞上に転がりはじめ（ローリング（rolling））、やがて強固に接着し（firm adhesion）、血管間隙を通り抜け（transmigration）、血管内膜を肥厚させたり、炎症反応を増長させたりする。この一連のローリングには、白血球又は血管内皮細胞上に発現しているセレクチンと、白血球又は血管内皮細胞上に発現しているシリアルリスX等の糖鎖（セレクチンリガンド）とが関与することが知られている。次の接着には、白血球上に発現しているインテグリンと、内皮細胞上に発現している免疫グロブリンスーパーファミリーと呼ばれる分子群が関与することが知られている。従って、これらの現象をブロックし、白血球の血管内皮細胞への接着を阻害すれば、白血球の血管外への浸潤を抑制し、血管内膜の肥厚や炎症反応を抑制することが期待されている。

【0004】また、接着分子であるICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）は、LFA-1（lymphocyte function associated antigen-1）のリガンドとして最初に同定された分子である。炎症時に白血球は

ICAM-1/LFA-1を介して血管内皮細胞と接着し、炎症局所に浸潤する。とくに表皮の炎症性疾患（扁平苔癬、乾癬、接触皮膚炎など）における表皮角化細胞（KC）のICAM-1発現がLFA-1陽性リンパ球の表皮への浸潤に誘導的役割をしている可能性が報告されていた（皮膚臨床 35(8)特：33；1343-1356, 1993）。従って、KCのICAM-1発現を阻害することにより、炎症性疾患の抑制が期待されている。

【0005】一方、多硫酸化ムコ多糖類の1種である多硫酸化コンドロイチン硫酸（ヘパリン類似物質）は、血液凝固抑制作用、末梢血液循環促進作用、繊維芽細胞増殖抑制作用を有することが知られている。また、多硫酸化コンドロイチン硫酸は、皮膚保湿作用を有し、乾皮症、皮脂欠乏症、進行性指掌角皮症などの乾燥性皮膚疾患にも有用性が知られている。しかしながら、上記機序による動脈硬化抑制作用、皮膚細菌感染阻害作用等は知られていなかった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、多硫酸化ムコ多糖類に着目し、その新たな用途について研究した結果、多硫酸化コンドロイチン硫酸などの多硫酸化ムコ多糖類が優れたセレクチン依存性細胞接着阻害作用及び皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用等を有することを見出した。

【0007】すなわち、本発明は、以下の阻害剤及び予防又は治療薬を提供するものである。

項1. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とするセレクチン依存性細胞接着阻害剤。

項2. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする血管内膜肥厚及び血管狭窄阻害剤。

項3. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする動脈硬化の予防又は治療薬。

項4. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする皮膚角化細胞の接着分子発現阻害剤。

項5. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする皮膚細菌感染症の予防又は治療薬。

項6. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする移植片対宿主病の予防又は治療薬。

項7. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする扁平苔癬症の予防又は治療薬。

項8. 多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用に基づく乾癬の予防又は治療薬。

【0008】さらに、本発明は、多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする、白血球と血管内皮との接着阻害作用に基づく血管疾病の予防又は治療薬を提供するものである。また、本発明は、多硫酸化ムコ多糖類を有効成分とする、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用に基づく皮膚疾病の予防又は治療薬を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明で使用する多硫酸化ムコ多糖類は、ヘキソサミンとウロン酸又はガラクトースよりなる二糖の繰り返し単位を有する長鎖多糖類に、化学的に硫酸基を導入することによって合成されたものを意味する。天然由来のムコ多糖類には、硫酸基を持つものも存在するので、それらをさらに化学的に多硫酸化したものも本発明の多硫酸化ムコ多糖類に包含される。

【0010】また、本発明の多硫酸化ムコ多糖類は、必要に応じ、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン類等を用いる造塩反応により得られる生理学的に許容される塩形態として使用することもできる。

【0011】本発明において、ヘキソサミンとは、広く、ヘキソースのヒドロキシル基がアミノ基で置換された化合物を意味するが、具体的には、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン等が挙げられる。

【0012】また、ウロン酸とは、アルドースの第一アルコールが酸化されてカルボキシル基となったものを広く意味するが、具体的にはD-グルクロン酸、L-イズロン酸、D-ガラクトツロン酸、D-マンヌロン酸、L-グルロン酸等の天然由来のウロン酸が例示される。

【0013】ムコ多糖類の具体例としては、コンドロイチン硫酸（コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸等）、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン等が挙げられる。

【0014】また、多硫酸化ムコ多糖類としては、多硫酸化コンドロイチン硫酸、多硫酸化ヘパラン硫酸、多硫酸化ケラタン硫酸、多硫酸化デルマトン硫酸、多硫酸化ヒアルロン酸等が挙げられ、日本薬局方外医薬品規格に記載のヘパリン類似物質（以下、MPSという）、コンドロイチン硫酸Dやコンドロイチン硫酸Eなどの多硫酸化コンドロイチン硫酸及びケラタンポリ硫酸が好ましい。さらに好ましくは、MPSなどの多硫酸化コンドロイチン硫酸である。

【0015】本発明の多硫酸化ムコ多糖類はその由来を特に限定するものではないが、より好適なものとしては、例えば前述のムコ多糖類に対して人為的に硫酸化処理を施すことによって硫酸化してなるものが挙げられる。

【0016】また、本発明の多硫酸化ムコ多糖類が有する硫酸基の数は特に限定されないが、単糖当たり、通常平均0.55～5個、好ましくは平均0.6～2.9個、より好ましくは平均0.7～2個の割合で有する。

【0017】本発明で用いられる多硫酸化ムコ多糖類又はその塩の分子量は、多糖の種類によっても異なり限定されるものではないが、その平均分子量が、数平均分子量で1000～10000000程度であり、好ましくは、5000～10000000程度、より好ましくは10000～100000程度、更に一層好ましくは10000～50000であることが望ましい。

【0018】ムコ多糖類に硫酸基を導入する方法としては、既知の方法、例えば、ムコ多糖類と硫酸化剤を適当な溶媒中で加温し、反応させる方法が挙げられる。硫酸化剤としては、多硫酸化の目的を達成することができるものであれば特に限定されるものではないが、無水硫酸とピリジン若しくはトリエチルアミン等の錯体を使用するのが好ましい。ムコ多糖類と硫酸化剤の使用割合は、所望の多硫酸化ムコ多糖類の硫酸化率（又は硫酸含有率）及び反応条件に従って任意に選択することができるが、一般に、ムコ多糖類1重量部に対して2～10重量部となるような割合で使用する。溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド等の親プロトン性溶媒を挙げることができる。反応温度、反応時間としては、所望の硫酸化率が達成できる限り特に限定されないが、例えば、40～90℃で30分～20日間程度反応させる。

【0019】上述のようにして生成した多硫酸化ムコ多糖類は、各種修飾多糖類で常用されている精製操作により精製することができる。例えば、中和、透析による脱塩、有機溶媒添加による沈殿を回収する操作、凍結乾燥による回収操作などが挙げられる。

【0020】本発明の阻害剤及び予防又は治療薬は、多硫酸化ムコ多糖類を含むことを特徴とするものであり、本発明の効果を損なわない限り、通常使用し得る生理学的若しくは薬学的に許容され得る担体、賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、界面活性剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味・矯臭剤又は安定剤等を包含することもできる。

【0021】また、本発明の阻害剤及び予防又は治療薬は、医薬製剤としての各種形態、例えば軟膏剤、硬膏剤、錠剤、ローション剤、液剤、懸濁剤、注射剤、エアゾール剤等の形態を治療目的に応じて選択できる。そして、患者の年齢、疾病の種類及び程度、並びに剤型及び投与様式により、例えば、局所、粘膜、皮膚、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、経口、経肺等により投与することができる。

【0022】軟膏剤に配合される添加剤としては、基剤、乳化剤、保存剤等が挙げられる。基剤としては白色ワセリン、流動パラフィン等の炭化水素、大豆等の油脂類、ミツロウ、ラノリン等のロウ類、ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸、ラノリンアルコール、セトステアリンアルコール等の高級アルコール及びそのエステル類、マクロゴール等が挙げられる。乳化剤としては、非イオン性界面活性剤等が挙げられる。保存剤としては、チモール、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

【0023】硬膏剤ないし貼付剤に配合される添加剤としては、増粘剤、保湿剤、充填剤、架橋剤、溶解剤、乳化剤等が挙げられる。増粘剤としては、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム等が挙げられ

る。保湿剤としては、グリセリン、マクロゴール類等が挙げられる。充填剤としては、カオリン、二酸化チタン、亜鉛華等が挙げられる。架橋剤としては、アセトアルデヒド、ジメチルケトン、硫酸アルミニウム等が挙げられる。溶解剤としては、エタノール、2-プロパノール等のアルコール類、マクロゴール類等が挙げられる。乳化剤としては、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

【0024】注射剤に配合される添加剤としては、pH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤などが挙げられる。

【0025】経口剤として調整する場合の添加剤としては、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、矯臭剤、矯味剤などが挙げられる。

【0026】本発明の阻害剤及び予防又は治療薬の投与量は、患者の年齢、性別、疾病の種類及び程度、並びに剤型及び投与様式により、適宜決定される。

【0027】製剤中の多硫酸化ムコ多糖類の含有量は、剤型によって適宜決定されるが、好ましくは、0.001～50重量%程度、さらに好ましくは0.001～10重量%程度、より一層好ましくは0.05～1重量%程度である。

【0028】本発明において、白血球と血管内皮との接着阻害作用に基づいて、予防又は治療される血管疾病としては、動脈硬化等が挙げられる。

【0029】本発明において、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用に基づいて、予防又は治療される皮膚疾病としては、皮膚細菌感染症、移植片対宿主病、扁平苔癬\*

\*症、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎等が挙げられる。

【0030】

【実施例】以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0031】実施例1 ヒト表皮角化細胞の培養

25cm<sup>2</sup> フラスコ中、10<sup>6</sup>個のヒト表皮角化細胞（オリエンタル酵母(株)製；以下、KCとする）を、KC用無血清培地（GIBCO社製；以下KBMとする）に50μg/mLの牛脳抽出物（GIBCO社製）と5ng/mLのヒト遺伝子組換え上皮成長因子（GIBCO社製；以下、EGFとする）とを含有させた5mLの培養液（以下KGMとする）で培養した。KCの継代はプロナーゼ処理により行い、2継代したKCを96ウェルプレートに播種、培養し、サブコンフルエントになった状態で供試した。

【0032】実施例2 KCにおけるインターフェロンγ（IFN-γ）刺激によるICAM-1発現に対するMPS等の作用検討

96ウェルプレートにおける培養でサブコンフルエントになったKCの培養上清を除去し、200μL/wellのKBMで緩やかに洗浄した。次に、下記表1に示す濃度のMPS等の薬剤の存在下又は非存在下、100ng/mLのIFN-γを含有させた200μL/wellのKGMを、KCに加えて48時間培養した。陰性対照群には200μL/wellのKGMのみを加えた。

【0033】

【表1】

群 名	濃 度	例 数
陰性対照	—	4ウェル
陽性対照（IFN-γ刺激 50ng/mL）	—	4ウェル
MPS	10μg/mL	4ウェル
MPS	100μg/mL	4ウェル
ヘパリン	100μg/mL	4ウェル
コンドロイチン4-硫酸	100μg/mL	4ウェル
コンドロイチン6-硫酸	100μg/mL	4ウェル

【0034】培養終了後、上清を除去し、200μL/wellのリン酸緩衝生理食塩液（以下、PBSとする）でKCを1回洗浄した。KCに100μL/wellのPLP溶液（2%パラホルムアルデヒド、75mM L-リシン、10mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム、37.5mMリン酸、pH6.2）を加えて室温で15分間放置することにより固定した後、200μL/wellのPBSで3回洗浄し、さらにBSA（ウシ血清アルブミン）を2%含有させたPBS（以下、BSA/PBSとする）を100μL/well添加して室温で20分間放置することによりブロッキングを行った。次に、ブロッキング液を除去後、一次抗体（抗ヒトICAM-1 mAb；Upstate Biotechnology社製）を10μg/mL含有させた0.2% BSA/PBSを50μL/well添加して、室温で30分間放置した。ブランクウェルにはBSA/PBSのみを添加した。KCを200μL/wellのPBSで3回洗浄後、二次抗体

（ビオチン標識された抗マウスIgG（H+L）；Vector社製）を10μg/mL含有させた0.2% BSA/PBSを50μL/well添加して室温で30分間放置した。200μL/wellのPBSで3回洗浄後、ABC-AP（ビオチン化アルカリフォスファターゼ-アビジン複合体）溶液を50μL/well添加して室温で30分間放置した。さらに200μL/wellのPBSで3回洗浄し、100μL/wellのpNPP（p-ニトロフェニルホスフェート）溶液（5mM）を加えて室温で10分間放置後、405nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。測定結果を図1及び2に示す。

【0035】IFN-γ刺激したKCのICAM-1発現は無処置群に比べて顕著に増加した。MPSは、IFN-γによるICAM-1の発現を濃度依存的に有意に抑制した（図1）。また、有意な作用を認めた100μg/mLのMPSのICAM-1発現抑制作用を同濃度の他の

ムコ多糖（ヘパリン、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸）と比較したところ、MPSは最も強くICAM-1発現を抑制した（図2）。

【0036】これらの結果から、MPSは、炎症時に、IFN- $\gamma$ で誘導されるICAM-1を介した細胞湿潤抑制作用を有し、さらには炎症性皮膚疾患に有用であることが示唆される。

#### 【0037】実施例3

HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）の培養

HUVECを、I型コラーゲンコートしたF-75フラスコ中にて、FBS（仔ウシ胎児血清）を10%及びECGF（endothelial cell growth factor; 100倍希釈）を含むMCDB131培地で培養し、0.025%トリプシン/0.01%EDTA処理により適宜継代培養した。I型コラーゲンコートした24ウェルプレートに、 $4 \times 10^4$ セル/mLの細胞密度で播種し、24時間培養後、細胞を接着の試験に供試した。供試された細胞は継代数5であった。

【0038】EoL-1細胞（好酸球様株化細胞）の培養

EoL-1細胞を、FBSを10%含むRPMI-1640培地で培養し、 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ セル/mLの細胞密度で適宜継代培養し（継代数：13～15以上）、下記の蛍光ラベル処理を施した後、接着の試験に供試した。

#### 【0039】供試細胞の蛍光ラベル

前記のとおり培養されたEoL-1細胞をPBSで洗浄した後、約 $5 \times 10^6$ セル/mLの細胞密度で、BCECF-AM（2',7'-bis(carboxyethyl)-4又は5-carboxyfluorescein）（5 $\mu$ M）とBSA（0.1%）とを含むHBSS（Hanks' balanced salts）に懸濁し、5%CO<sub>2</sub>/95%air中で（37℃）30分インキュベートした。インキュベート終了後、細胞をPBSで1回洗浄し、FBSを1%含むRPMI-1640培地に希釈し、接着の試験に使用した。

#### 【0040】接着試験

24ウェルプレート上で培養したHUVECに、TNF $\alpha$ （100U/mL）とFBS（10%）とを含むMCDB131培

\* 地を添加し、4時間インキュベートした。インキュベート終了後、HUVECをPBSで1回洗浄し、MPS（0.1%及び1%）と1cm<sup>2</sup>あたり $4 \times 10^4$ 個の蛍光ラベル化EoL-1細胞とを添加した。5%CO<sub>2</sub>/95%air中で（37℃）、プレートシェーカー上で水平に回転振盪（150rpm）しながら30分インキュベートした。インキュベート終了後、HUVECに接着していないEoL-1細胞をPBSで1回洗浄することにより除去した。HUVECに接着しているEoL-1細胞をNaOH（1M）で溶解し、残存している蛍光強度を測定した（励起：485nm、蛍光：530nm）。測定結果を図3に示す。

【0041】図3より明らかなように、MPSは、EoL-1細胞とHUVECの接着反応を抑制し、セレクトイン依存性細胞接着阻害作用を示すことがわかる。

#### 【0042】

【発明の効果】多硫酸化ムコ多糖類は、セレクトイン依存性細胞接着阻害作用、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用等により、セレクトイン依存性細胞接着阻害剤、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害剤、血管内膜肥厚及び血管狭窄阻害剤として、又は皮膚細菌感染症等の予防又は治療薬として有用である。

【0043】特に、セレクトイン依存性細胞接着阻害作用に基づく血管疾病の予防又は治療薬として有用であり、とりわけ動脈硬化の予防又は治療薬として有用である。

【0044】さらに、皮膚角化細胞の接着分子発現阻害作用に基づく、乾癬、皮膚細菌感染症、移植片対宿主病、扁平苔癬症等の皮膚疾患の予防又は治療薬として有用である。

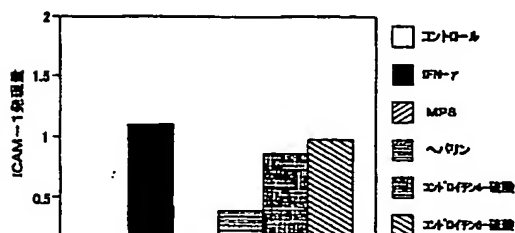
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】IFN- $\gamma$ 刺激したKCのICAM-1発現に対するMPS（0.1%及び1%）の影響を示すグラフである。

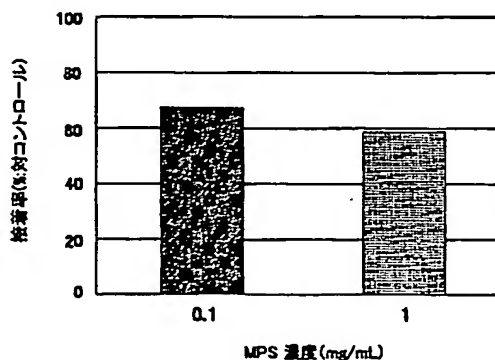
【図2】IFN- $\gamma$ 刺激したKCのICAM-1発現に対する各種ムコ多糖の影響を示すグラフである。

【図3】EoL-1細胞とHUVECとの接着に対するMPSの影響を示すグラフである。

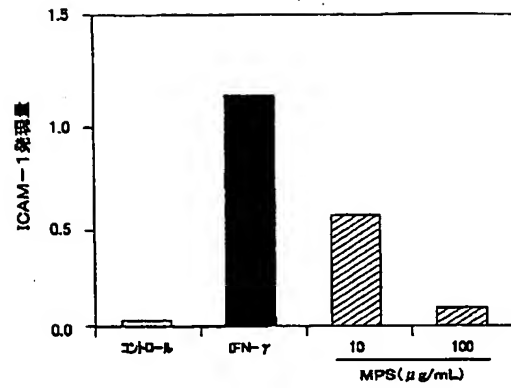
【図2】



【図3】



【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターム (参考)
A 6 1 P 17/04		A 6 1 P 17/04	
	17/06	17/06	
// C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08	Z
	37/10	37/10	
F ターム (参考)	4C086 AA01 AA02 EA26 EA27 MA01		
	MA04 NA14 ZA44 ZA45 ZA89		
	ZA90 ZA91 ZB21 ZC41		
	4C090 AA09 BA64 BA65 BA66 BA67		
	BA68 BB54 DA09 DA23		